

DIVERGÊNCIA GENÉTICA DE SERINGUEIRA ATRAVÉS DE MARCADORES MICROSSATÉLITES

ROMÃO, L. R. C¹; CARDOSO, J. M. K.²; GONÇALVES, P. de S.³; RUBIANO, L.B²

Nº10119

RESUMO

Conhecer a diversidade genética dos clones promissores do programa de melhoramento genético da seringueira e estimar a divergência genética entre eles é de grande utilidade para direcionar futuros cruzamentos. Ao todo, 40 clones de *H. brasiliensis* foram coletados além de sete espécies adicionais, totalizando 52 novos genótipos genotipados. Optou-se por utilizar EST-SSRs oriundos de seqüências expressas (microssatélites gênicos) para acessar a diversidade genética dos materiais. A estrutura genética dos clones foi avaliada segundo as distâncias genéticas modificadas de Rogers, e o agrupamento por UPGMA (dendrograma). Os genótipos foram divididos em dois grandes grupos, um formado por genótipos brasileiros e outro grupo formado por genótipos malaaios. Esta separação em grupos pode indicar que os programas de melhoramento genético desenvolvidos aqui no Brasil e na Malásia podem estar praticando pressões de seleção diferentes em seus programas. Os clones PB235 falso e verdadeiro puderam ser diferenciados e genótipos aparentados contendo um mesmo parental masculino e feminino também puderam ser distinguidos por esta análise. Houve também boa transferibilidade dos locos analisados entre as demais espécies do gênero *Hevea*. Os microssatélites gênicos mostraram ser uma ferramenta poderosa para acessar a diversidade genética de clones de seringueira.

ABSTRACT

The knowledge of the genetic diversity of elite clones from rubber tree genetic breeding program is very important to estimate and direct future crosses. A total of 40 *H. brasiliensis* clones were collected beside seven additional species, totalizing 52 new genotypes. EST-SSRs selected from expressed sequences (genic microsatellites) were used to access the genetic diversity between the materials. The genetic structure of the clones was evaluated using Rogers modified genetic distances, and the UPGMA coefficient (dendrogram).. Genotypes were divided into two large groups, one of them constituted by Brazilian genotypes and the other by Malaysian genotypes.

1. Bolsista CNPq: Graduação em Ciências Biológicas, Unicamp, Campinas-SP, karlineu@yahoo.com.br
2. Colaboradora: Doutorado em Agricultura tropical e subtropical, IAC, Campinas-SP
3. Orientadora: Pesquisadora, Centro de P&D de Recursos genéticos Vegetais, IAC, Campinas-SP
4. Co-orientador: Pesquisador, Programa Seringueira, Embrapa/IAC, Campinas-SP

This separation may indicate that different selection pressures might have been applied in the Malaysian and in the Brazilian breeding programs. The true and false PB235 clones could be differentiated as well as the genotypes having a common male or female parent. There was a good transferability from the analyzed loci for the other species of the *Hevea* genera. Genic microsatellites showed to be a powerful tool for accessing the genetic diversity among rubber tree clones.

INTRODUÇÃO

A seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. ex Ait.) Muell-Arg.] espécie nativa da Amazônia, pertencente a família Euphorbiaceae é a maior fonte de borracha natural do mundo, matéria-prima de grande importância em diversos setores industriais e de qualidade superior ao produto sintético.

Segundo Gonçalves *et al* (2002), a despeito de ser o berço da espécie e principal produtor e exportador no final do século XIX, o Brasil passou a condição de importador dessa matéria prima no início do século passado.

Dados do IRSG (2008) revelam que em 2007 a produção mundial de borracha natural atingiu 9.873 mil toneladas, das quais o Brasil contribuiu, apenas, com 107,8 mil toneladas, cerca de 1% do total. Nesse ano o consumo nacional foi de 286,4 mil toneladas, ou seja, importou-se mais de 60% da borracha consumida no país.

Programas de melhoramento genético têm sido fundamentais para o aumento de produção e obtenção de outros caracteres desejáveis nas mais diversas culturas. A seringueira por ser uma cultura perene, tem um longo ciclo de melhoramento (Priyadarshan & Clement-Demange, 2004; Marques *et al.*, 2002 e Tan, 1987), pelo fato de envolver diversas etapas de avaliação e seleção. Segundo Gonçalves *et al.* (1988) é necessário cerca de 30 anos para completar o ciclo, partindo-se da polinização controlada à recomendação final de um clone. Com o intuito de reduzir esse período, vários autores (Subramanian, 1980; Tan *et al.* 1981; Marques & Gonçalves, 1990), consideram que qualquer mudança que possa ser feita para reduzir o ciclo de melhoramento sem reduzir o ganho genético pode resultar em um programa mais eficiente.

Conhecer e utilizar a diversidade genética existente é a base de qualquer programa de melhoramento genético que envolva hibridações. Para Vieira *et al.* (2005) é de fundamental importância que o melhorista conheça profundamente o germoplasma disponível, em termos de desempenho agrônomo por si só, capacidade de combinação e dissimilaridade genética (divergência), sendo que a estimativa da dissimilaridade genética cresce em importância, pois quando combinada com o conhecimento do comportamento por si só dos genitores pode ser uma alternativa a realização de cruzamentos dialélicos, na indicação de constituições genéticas com alta capacidade de combinação.

A estimativa da divergência genética é feita a partir de estudos de diversidade genética. Aguiar & Gonçalves (2006) ressaltam que a exploração adequada da variabilidade genética existente em diversos caracteres agrônômicos, por meio de

polinizações controladas entre genótipos com divergência genética satisfatória, aumentaria a eficiência do melhoramento genético para obtenção de novos cultivares de seringueira.

Em seringueira, a divergência genética foi estimada através de técnicas multivariadas por Mydin *et al.* (1992), Paiva (1994) e Aguiar & Gonçalves (2006) e através de marcadores moleculares RAPD (Marques *et al.*, 2002 e Ventakachalan *et al.*, 2002) e SSRs (Lekawipat, 2003). Estes últimos foram considerados mais informativos e robustos.

MATERIAL E MÉTODOS

Cinqüenta e dois clones de seringueira selecionados nos experimentos de avaliação de clones do Programa de Melhoramento Genético do Instituto Agrônomo (IAC) em Campinas, SP (Tabela 1) foram coletados e utilizados. Esses genótipos encontram-se distribuídos em experimentos sob delineamento de blocos ao acaso, com três repetições, nos Polos Regionais de Pindorama e Votuporanga: Dia 24 de abril de 2009 coletou-se 17 materiais na Estação Experimental de Pindorama e 26 materiais foram coletados na Estação Experimental de Votuporanga no dia 25 de abril de 2009.

Seis espécies diferentes de *Hevea brasiliensis* foram incluídas para verificação da transferibilidade dos locos de microssatélites entre espécies do gênero *Hevea* tal como demonstrado por Souza *et al.* (2009). DNA destas seis espécies (*H. guianensis*, *H. rigidifolia*, *H. nitida*, *H. pauciflora*, *H. benthamiana*, e *H. carmagoana*) foram cedidos pela Dra. Anete P. de Souza (CBMEG/UNICAMP) tendo sido coletados do CNSG da Embrapa Amazônia Ocidental (Manaus, AM).

Os locos obtidos por Feng *et al.* (2009) e utilizados neste estudo provém de uma biblioteca de ESTs desenvolvida para análise da expressão de genes laticíferos por Chow *et al.* (2007). Esta biblioteca foi obtida de árvores de *H. brasiliensis* de quinze anos da Malásia e os cDNAs obtidos a partir de tecido de vaso laticíferos.

Amostras de folhas de cada um dos clones foram coletadas e congeladas em nitrogênio líquido, liofilizadas por 72h (-60°C, 05 a 10 microns de Hg) e depois, moídas em moinho mecânico (Ciclotec-1093 Sample Mill, Tecator). O pó resultante está acondicionado e armazenado em freezer – 20°C. A extração do DNA foi realizada a partir do pó de cada amostra de acordo com a metodologia do CTAB descrita por Hoisington *et al.* (1994), com modificações de acordo como referido no relatório anterior. As reações de amplificação foram preparadas contendo 100 ng de DNA, 1 U de *Taq*-DNA polimerase, 1,5 mM de cloreto de magnésio, 0,20 mM de cada dNTP e 0,8 µM de cada *primer* (*forward* e *reverse*), e 1x de tampão da enzima, num volume total de 15 µL. As amostras amplificadas foram visualizadas em gel de agarose 3 % corado com brometo de etídio. A genotipagem do material foi feita em poliácridamida a 6%, corado com prata de acordo com (Creste *et al.* 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

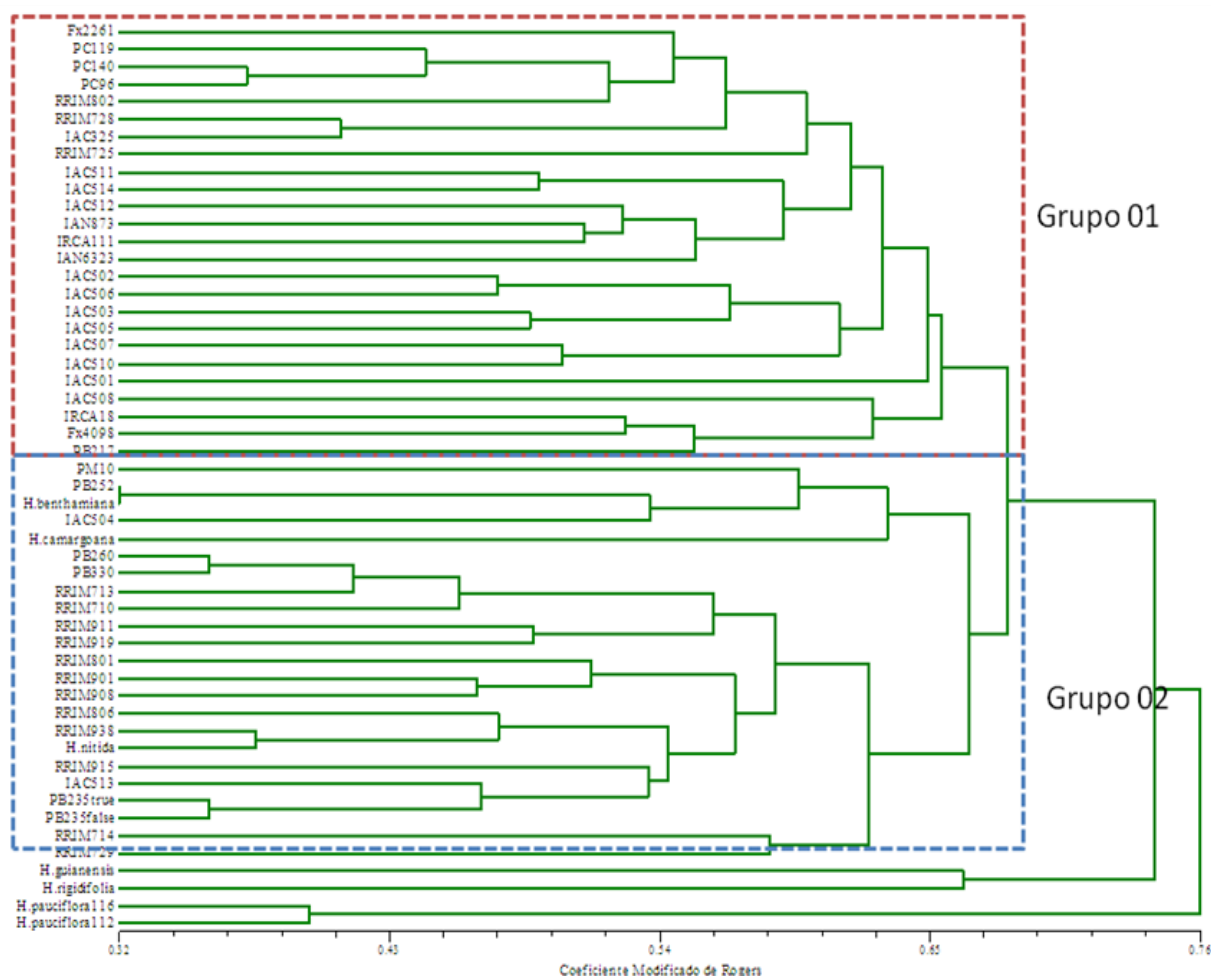


Figura 1. Dendrograma gerado a partir das distâncias modificadas de Rogers baseadas em dados de 30 EST-SSRs utilizados na avaliação de 52 novos clones de seringueira.

Os trinta EST-SSRs utilizados para amplificar os clones de *Hevea* tiveram um valor médio de PIC (0,58) compatível ao anteriormente estimado para aos microssatélites genômicos (0,57 em média) com 60 genótipos de seringueira (relatório anterior). Entretanto, enquanto naquela ocasião o PIC oscilou de 0,11-0,87, neste estudo o PIC mínimo foi de 0,22. Feng *et al.* (2009), utilizando o mesmo conjunto de EST-SSRs encontraram valores inferiores de PIC, variando de 0-0,68 com media de 0,57. Embora os mesmos locos tenham sido utilizados nos dois estudos, a heterozigosidade do material em questão aqui é mais alta, o que expressa um maior poder de informatividade associado a cada marcador. A distância genética média foi de 0,66 (moderada). A maior distância genética encontrada foi entre *H. rigidifolia* com o clone IAC506 (0,97) seguida da distância entre *H. rigidifolia* com o clone amazônico Fx2261, resultante do cruzamento Ford.

De acordo com a análise de agrupamento dos genótipos (Figura 1) com microssatélites gênicos, os genótipos foram divididos em dois grandes grupos, um formado por genótipos brasileiros (IAC e Amazônicos, Grupo 01) e outro grupo

formado por genótipos malaios. Esta separação em grupos pode indicar que os programas de melhoramento genético desenvolvidos aqui no Brasil e na Malásia podem estar promovendo um distanciamento genético entre estes clones por praticarem pressões de seleção diferentes em seus programas. Os EST-SSRs foram muito eficazes na distinção de genótipos aparentados contendo um mesmo parental masculino e feminino como é o caso dos genótipos: 1) RRIM 710 e RRIM 713, que tem os genitores RRIM 601 x RRIM 701 em comum; 2) RRIM 908 e RRIM 911, que tem os genitores PB 5/51 x RRIM 623; 3) RRIM 915 e RRIM 919, que tem os genitores RRIM 605 e PB 5/51.

Os clones PB235 falso e PB235 verdadeiro puderam ser diferenciados por esta análise com os EST-SSRs exibindo uma distância genética pequena (0,35). Em Souza *et al.* (2009), 27 novos SSRs genômicos foram obtidos de bibliotecas enriquecidas e a diversidade genética de 31 genótipos de *H. brasiliensis* além de seis espécies selvagens (*H. guianensis*, *H. rigidifolia*, *H. nitida*, *H. pauciflora*, *H. benthamiana*, e *H. carmagoana*) foi avaliada. Houve total transferibilidade dos locos testados neste trabalho com as demais espécies do gênero *Hevea*.

Os resultados mostraram que os microssatélites gênicos foram eficazes para traduzir o conteúdo de diversidade genética presente entre os clones de seringueira avaliados e representam uma ferramenta poderosa para auxiliar o direcionamento de futuros cruzamentos.

CONCLUSÃO

Podemos supor que os microssatélites gênicos desenvolvidos por Feng *et al.* (2009), oriundos biblioteca de ESTs desenvolvida para análise da expressão de genes laticíferos, tiveram condições de acessar de forma mais eficaz a diversidade genética de clones de *Hevea brasiliensis* e também de espécies selvagens do que os microssatélites anteriormente desenvolvidos que se basearam em seqüências toatis depositadas no NCBI sem considerar a origem das mesmas. Talvez uma explicação para isto esteja no fato de que a maioria dos programas de *Hevea* utiliza como fator de seleção a questão da produção de látex, e de certa forma estes locos de EST-SSR estariam mais próximos das características valorizadas e selecionadas nos programas de melhoramento de seringueira, sendo portanto mais informativos e discriminatórios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, A.T.E. & GONÇALVES, P. de S.. Diversidade genética em genótipos de *Hevea* de origem amazônica e asiática. Revista Ceres, Viçosa, v.53, n.307, 205-291, 2006.
- CHOW, K-S.; WAN K-L; ISA, M.N.M.; BAHARI, A.; TAN, S-H. HARIKRISHNA, K.; YEANG, H-Y. Insight into rubber biosynthesis from transcriptome analysis of *Hevea brasiliensis* latex. J. Exp. Bot., v.58, n.10, p.2429-2440, 2007.
- CRESTE, S.; TULMANN-NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. Plant Molecular Biology Reporter, v.19, p.299-306, 2001.

FENG, S.P.; LI, W.G.; HUANG, H.S.; WANG, J.Y.; WU, Y.T.. Development, characterization and cross-species/genera transferability of EST-SSR markers for rubber tree (*Hevea brasiliensis*). Mol. Breeding, v.23, p.85-97, 2009.

GONÇALVES, P. de S. Uma história de sucesso: A seringueira no Estado de São Paulo. O Agrônomo, Boletim Técnico, v.54, p.6-10, 2002.

GOUVEA, L. R. L. et al. Genetic divergence of rubber tree estimated by multivariate techniques and microsatellite markers. Genet. Mol. Biol. [online]. 2010, vol.33, n.2, pp. 308-318.

HOISINGTON, D.; KHAIRALLAHM AND GONZALEZ-DE-LION D Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. 2nd edition. CIMMYT, Mexico DF, 1994,.

LEKAWIPAT, N.; TEERAWATANASUK, M. M.; RODIER-GOUD, M. S. N.; VANAVICHIT, A.;

MARQUES, J. R. B.; GONÇALVES, P. de S.. Comportamento de novos clones de seringueira da série Sial (Primeira Seleção) em Una (Ba). Pesquisa Agropecuária brasileira, 25, n.7, p. 971-978, 1990.

MYDIN, K.K.; V. GOPINATHAN NAIR; SETHURAJ, M.R., SARASWATHY, P.; PANIKKAR, O.N.. Genetic divergence in *Hevea brasiliensis*. Indian Journal of Natural Rubber Research, v.5, p120-126, 1992.

PAIVA, J.R.. Divergência genética entre clones primários de seringueira. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília. v.29, n.4, 607-615, 1994.

PRIYARDARSHAN; CLEMENT-DEMANGE, A. Breeding *Hevea* Rubber: Formal and Molecular Genetics. Advances in Genetics, v.52, p. 51-105, 2004.

SUBRAMANIAN, S. Desenvolvimento nas pesquisas de melhoramento de *Hevea* e seu futuro. 1980. In: SEMINÁRIO NACIONAL DA SERINGUEIRA, 3, Manaus, Anais, Manaus, v.1, p.422-455.

SOUZA, M.L.; MANTELLO, C.C.; SANTOS, M.O.; GONÇALVES, P.S.; SOUZA, A.P. Microsatellite from rubber tree (*Hevea brasiliensis*) for genetic diversity and cross-amplification in six *Hevea* wild species. Conservation Genet Resour., doi 10.1007/s1286-009-9018-7.

TAN, H.; ONG, S.H.; SULTAN; M.O. & KHOO, S.K. 1981. Potential of promotion plot clone trials in shortening clonal evaluation period. In: INTERNATIONAL RUBBER RESEARCH DEVELOPMENT BOARD SYMPOSIUM, Hat Yai, Thailand, 8p.

TAN, H. Strategies in rubber tree breeding. In: ABBOT, A. J.; ATKIN, R. R. (Ed.). Improving vegetative propagated crops. London : Academic, p. 27-62, 1987

VENKATACHALAN, P.; THOMAS, S.; PRIYA, P.; THANSEEM, I.; GIREESH, T.; SARASWATHY, C.K.; THULASEEDHARAN, A.. Identification of DNA Polymorphism among clones of *Hevea brasiliensis* Muell-Arg. using RAPD analysis. *Plant Cell Reports*, 15: 172-181, 2002

VIEIRA, E. A.; CARVALHO, F.I.F.; OLIVEIRA, A.C.; BENIN, G.; ZIMMER, P. D.; SILVA, J.A.G.; MARTINS, A.F.; BERTAN, I., SILVA, G.O.; SCHIMIT, D.A. M. Comparação entre medidas de distância genealógica, morfológica e molecular em aveia em experimentos com e sem a aplicação de fungicida. Bragantia, Campinas,, v.64, n.1, p.51-60, 2005.